

Ane Caroline Lino Salgueiro

VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Drosophila capricorni* ORIUNDAS DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE SANTA CATARINA USANDO O MARCADOR *COI*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Norma
Machado da Silva

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Salgueiro, Ane Caroline Lino

VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Drosophila*
capricorni ORIUNDAS DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE
SANTA CATARINA USANDO O MARCADOR COI / Ane Caroline
Lino Salgueiro ; orientadora, Norma Machado da
Silva, 2018.

43 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Genética de Populações
. 3. *Drosophila*. 4. mtDNA. 5. Biodiversidade
Genética. I. Silva, Norma Machado da. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Drosophila capricorni* ORIUNDAS DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE SANTA CATARINA USANDO O MARCADOR *COI*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 19 de junho de 2018

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Norma Machado da Silva, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Daniela Cristina De Toni,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Carlos Frederico Deluqui Gurgel,
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a minha família que sempre me apoiou na escolha desta profissão e no caminhar da minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Centro de Ciências Biológicas pela oportunidade de realizar este curso que tanto contribuiu para a minha formação e vida pessoal.

À Prof. Dra. Norma Machado da Silva, pela cuidadosa orientação, apoio e confiança na elaboração deste trabalho. Você foi a melhor orientadora que eu podia ter, sempre paciente em sanar minhas dúvidas e acompanhar todas as etapas desse trabalho. Muito obrigada.

A Fapesc pelo apoio financeiro no projeto ao qual este trabalho de conclusão de curso fez parte.

À minha família, em especial minha mãe Maria, minha irmã Mary, meu tio Ribamar e minha prima Giovana, que nos momentos de minha ausência dedicados ao estudo superior, sempre me incentivaram para a realização deste sonho de forma compreensiva e carinhosa.

Ao Mateus, que me acompanhou durante toda a minha graduação. Seu apoio e motivação foi imprescindível na realização deste trabalho.

Aos professores Dra Daniela De Toni, Dr. Carlos Frederico Deluqui Gurgel e Dra. Andrea Rita Marrero que aceitaram o convite para compor a banca deste trabalho de conclusão de curso, obrigada por suas considerações, elas foram essenciais para a melhoria desta versão final.

A todos os professores, amigos e conhecidos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação nestes últimos anos, o meu agradecimento mais sincero.

“Nada na biologia faz sentido exceto à luz da evolução.”
(Theodosius Dobzhansky, 1973)

RESUMO

Drosophila capricorni pertence a família *Drosophilidae*, subgênero *Sophophora*, grupo *willistoni*. Para acessar a variabilidade genética de três populações de *D. capricorni* em Santa Catarina foi utilizado o gene mitocondrial citocromo oxidase I (*COI*). As coletas foram realizadas em três unidades de conservação: Reserva Biológica Estadual da Canela Preta, Reserva Biológica Estadual do Aguai e o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. A captura das moscas foi realizada utilizando armadilhas de frutas fermentadas e sua identificação foi realizada a partir de caracteres morfológicos. Foram sequenciados 663 pb do gene mtCOI, de 32 indivíduos machos (9 Aguai, 13 Canela preta e 12 Tabuleiro). Foram realizadas análises de diversidade genética, testes de neutralidade, cálculos de F_{st} , teste de seleção, montagem de rede de haplótipos através do uso de diferentes softwares. Foram observados 19 haplótipos e 20 sítios polimórficos nas três populações. O maior valor de π encontrado foi para a população Canela Preta, que obteve o maior número de haplótipos. Os cálculos de F_{st} apresentaram um único valor significativo, entre as populações Tabuleiro e Aguai. A ação antrópica e atividade siderúrgica na região, pode estar levando a uma diminuição nos corredores ecológicos que ligam essas populações de drosofilídeos. Os testes de neutralidade realizados apresentaram em sua maioria valores negativos, mas somente os testes F_s de F_u e R_2 apresentaram desvios significativos nas populações Aguai e Canela Preta e quando considerando as três populações juntas indicando um possível evento de expansão populacional ou ação da seleção purificadora. O resultado do teste de seleção mostrou que grande parte dos códons dessa sequência está sob forte influência da seleção purificadora.

Palavras-chave: Genética de populações. *Drosophila*. mtDNA. Biodiversidade Genética.

ABSTRACT

Drosophila capricorni belongs to the family *Drosophilidae*, ss *Sophophora* subgenus, *willistoni* group. In order to access the genetic variability of three populations of *D. capricorni* the mitochondrial gene, cytochrome oxidase I (COI), was used. The collections were carried out in three conservation units: the Canela Preta State Biological Reserve, the Aguai State Biological Reserve and the Serra do Tabuleiro State Park. Flies were captured using fermented fruit traps and their identification was performed from morphological characters. A fragment of 663 bp was analyzed from 32 males (9 from Aguai, 13 from Canela Preta and 12 from Tabuleiro). Genetic diversity analysis, neutrality tests, F_{st} calculation, selection test and construction of a haplotype network were performed using different software. We found 19 haplotypes and 20 polymorphic sites among the three populations. The highest value of π was found for the Canela Preta population, which obtained the highest number of haplotypes. The F_{st} presenting a significant value occurred only between the Tabuleiro and Aguai populations. Anthropogenic and steel mining in the region near UC Aguai may be leading to a decrease in the ecological corridors linking these drosophilids populations. The neutrality tests presented mostly negative values, but only the Fu's F_s and R_2 showed significant deviations in the Aguai and Canela Preta populations and when considering the three populations together. These results may have been caused by a possible event of local population expansion or by the action of the purifying selection. The result of the selection test showed that a large part of the codons of this sequence is under strong influence of the purifying selection.

Keywords: Population genetics. *Drosophila* mtDNA. Genetic Biodiversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica de <i>D.capricorni</i>	17
Figura 2. Modelo de conteúdo e organização do genoma mitocondrial baseado em 12 espécies de <i>Drosophila</i>	19
Figura 3. Localização das três Unidades de Conservação e distância em linha reta entre elas.....	23
Figura 4. Armadilha utilizada para captura de <i>Drosophilas</i> confeccionadas segundo o modelo de Tidon e Sene (1988).....	24
Figura 5. Rede de haplótipos construída a partir das sequências COI das três populações de <i>Drosophila capricorni</i>	30
Figura 6. Resultado do teste de seleção, realizado no software online Selecton, para o fragmento de 663 pb do gene COI em <i>D. capricorni</i> . 32	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Diversidade do Gênero <i>Drosophila</i> e seus subgêneros	15
Tabela 2.Coordenadas geográficas das populações amostradas.	23
Tabela 3 Índices de diversidade genética de populações de <i>D. capricorni</i> de Santa Catarina, usando o marcador mitocondrial COI.	28
Tabela 4 Resultados do testes de F_{st} e polimorfismo compartilhados e não compartilhado entre as populações de <i>D.capricorni</i>	29
Tabela 5. Resultados dos testes de neutralidade usados para análise dos polimorfismos de um fragmento do gene COI em populações de <i>D. capricorni</i> de Santa Catarina.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

COI- Citocromo oxidase I

DNA – Ácido desoxiribonucleico

dNTPs– Desoxirribonucleotídeos fosfatados (A, T, C, G)

Kb – Kilobase

Km- Kilometros

min- Minutos

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

ml – Mililitro

mM– Micromolar

mRNA– Ácido ribonucleico mensageiro

mtDNA- Ácido desoxiribonucleico (DNA) mitocondrial

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reactio

pb – Pares de base

s- segundos

tRNA– Ácido ribonucleico (DNA) mensageiro

U- Unidade

UC – Unidade de Conservação

UV – Ultravioleta

μM– Micromolar

μl– Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - Mi

τ - Tau

π – Pi

® - Marca Registrada

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
1.1 A FAMÍLIA DROSOPHILIDAE E A <i>Drosophila capricorni</i> ...	14
1.2 MARCADORES DE SEQUÊNCIA E DNA MITOCONDRIAL	18
1.2.1 Citocromo Oxidase I	20
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVO	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	23
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	24
4.3 CITOCROMO OXIDASE I	25
4.4 SEQUENCIAMENTO	25
4.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE MTCOI	27
5.2 ANÁLISES DE DIVERSIDADE	27
5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS	29
5.4 TESTES DE NEUTRALIDADE	29
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FAMÍLIA DROSOPHILIDAE E A *Drosophila capricorni*

A ordem Diptera (Classe: Insecta) compreende espécies de insetos holometábolos amplamente diversificados em relação a sua anatomia, ecologia e riqueza de espécies (BRUSCA; BRUSCA, 2007; YEATS; WIEGMANN, 2005). Possui distribuição cosmopolita, estando presente em todos os principais ambientes (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Compõem esta ordem as moscas, mosquitos, flebótomos e maruins (RUPPERT; BARNES, 2005).

Estima-se que existam cerca de 150.000 mil espécies de Dípteros distribuídos em 188 famílias. (THOMPSON; PAPER, 2013). Dentre as principais famílias encontra-se a família Drosophilidae, com origem em regiões tropicais há aproximadamente 50 a 60 milhões de anos (THROCKMORTON, 1975). São conhecidas cerca de 4.500 espécies distribuídas em 66 gêneros (BÄCHLI, 2017), sendo o gênero *Drosophila* o mais abundante (YASSIN, 2013). Atualmente o gênero *Drosophila* é subdividido em 9 subgêneros (O'GRADY; DESALLE, 2018) (Tabela 1).

As espécies do gênero *Drosophila* são conhecidas popularmente como “moscas das frutas” e possuem ampla distribuição, contendo representantes em praticamente todas as partes do mundo e em diversos tipos de ecossistemas (WHEELER, 1981; TIDON *et al*, 2005). Apesar de terem uma vasta distribuição geográfica, são nos trópicos que a família Drosophilidae ocorre em maior abundância e diversidade, pois são ambientes complexos com uma vegetação variada, e apresentam sub-regiões com diferentes microclimas e micro habitats. Podem ser encontradas tanto no nível do mar quanto em altas altitudes (THROCKMORTON, 1975). Em sua maioria, alimentam-se de microrganismos, principalmente leveduras, presentes em materiais vegetais em decomposição, como frutos, fungos e flores (MARTINS, 2001; GOTTSCHALK, 2004) e por esse motivo apresentam papel fundamental no ecossistema atuando nas cadeias alimentares saprófitas (THROCKMORTON, 1975). Algumas espécies são restritas ecologicamente, utilizando como sítio de reprodução, criação e alimentação apenas uma espécie hospedeira, enquanto outras são mais versáteis, podendo utilizar uma gama de recursos variada em diferentes plantas e/ou fungos (TIDON *et al*, 2005). Como exemplo temos espécies do “cluster” *Drosophila buzzati* que possuem associação ecológica obrigatória com espécies da família Cactacea, onde o desenvolvimento

larval ocorre em tecidos necrosados de cactos (MANFRIN; SENE, 2006). Espécies do grupo *flavopilosa* que utilizam apenas um substrato para a oviposição que ocorre em flores do gênero *Cestrum* (VILELA, 1984)

Tabela 1 Diversidade do Gênero *Drosophila* e seus subgêneros .

Ordem	Família	Gênero	Subgêneros ^c
			<i>Chusqueophila</i> (1)
			<i>Dorsilopha</i> (4)
			<i>Drosophila</i> (875)
			<i>Dudiaca</i> (2)
Diptera (150.000 ^a)	Drosophilidae (4.500 ^b)	<i>Drosophila</i> (1.655 ^c)	<i>Hawaiian Drosophila</i> (427)
			<i>Phloridosa</i> (8)
			<i>Psilodorha</i> (2)
			<i>Siphlodora</i> (2)
			<i>Sophophora</i> (344)

Nota. Valores entre “()” se referem ao número de espécies. Fonte: Elaborado pelo autor conforme ^aTHOMPSON, 2013, ^bBÄCHLI, 2017; ^cO’ GRADY: DESALLE, 2018

Moscas do gênero *Drosophila* vêm sendo utilizadas como modelo biológico desde o início do século passado. Diversos fatores

contribuem para a sua utilização, dentre eles: ciclo de vida curto, prole numerosa, número reduzido de cromossomos, fácil manuseio e praticidade do cultivo em laboratório (POWELL, 1997). O primeiro uso de *Drosophilas* em laboratório foi documentado em 1901 pelo grupo de William Castle em Harvard (JENNINGS, 2011). Contudo, atribui-se sua aplicação como modelo para pesquisas em genética às contribuições clássicas da equipe de Thomas Morgan e seus estudos sobre hereditariedade e mapeamento gênico (POWELL, 1997).

Desde 1981 sugere-se a utilização de insetos como bioindicadores da qualidade do ambiente (PYLE; BENTZIEN; OPLER, 1981; ROSENBERG; DANKS; LEHMKUH, 1986; BROWN, 1991). Dentre os principais fatores que possibilitam sua utilização para este fim, estão características como: número elevado de espécies; presença em diversos habitats onde são encontrados em grande quantidade; facilidade de amostragem (ROSENBERG *et al*, 1986), além de apresentarem tamanho reduzido; possuírem grande resiliência e responderem rapidamente a mudanças ambientais (BROWN, 1997). São importantes na função ecológica de ecossistemas naturais, contribuindo na polinização, dispersão de semente, reciclagem de nutrientes e fluxo de energia (MARTINS, 2001).

Neste sentido, estudos têm demonstrado que drosofilídeos podem ser sensíveis aos efeitos da fragmentação em períodos relativamente curtos de tempo (MARTINS, 2001). Estes insetos são altamente sensíveis a pequenas modificações no ambiente e isto se reflete no tamanho de suas populações naturais (TIDON-SKLORZ; SENE, 1992). Algumas espécies possuem associação com a pressão antrópica no ambiente, outras são típicas de ambientes preservados (BIZZO, 2010).

A *Drosophila capricorni* é uma espécie do subgênero *Sophophora* (STURTEVANT, 1935), grupo formado por cerca de 344 espécies subdividido em nove grupos, dentre eles se encontra o grupo *willistoni* onde *D. capricorni* está inserida (O'GRADY; DESALLE, 2018). Este grupo possui distribuição neotropical, sendo encontrado desde a Flórida (EUA) até o Uruguai e norte da Argentina (DOBZHANSKY; POWELL, 1975). Possui 23 espécies, as quais se distribuem em três subgrupos: *alagitans*, *bocainensis*, *willistoni* (EHRMAN; POWELL, 1982; (BÄCHLI, 2017).

Em 1943, Dobzhansky e Pavan realizaram um estudo preliminar sobre a fauna de drosofilídeos presente nos estados de São Paulo e Distrito Federal e descreveram duas espécies que posteriormente fariam parte do grupo *willistoni*: *D. capricorni* e *D. paulista* (DOBZHANSKY; PAVAN,

1943). Geograficamente, *D. capricorni* está presente em diversos estados Brasileiros (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Maranhão e Belém do Pará) (ZANINI; DEPRÁ; VALENTE, 2015; SANTA-BRÍGIDA; SCHMITZ; MARTINS, 2017) assim como no Peru, Venezuela, Colômbia, México e Panamá (ZANINI; DEPRÁ; VALENTE, 2015)

Figura 1. Distribuição geográfica de *D. capricorni*. (Figura 1).



Nota: Países com registro da presença de *D. capricorni*. Fonte: Adaptado de ZANINI; DEPRÁ; VALENTE (2015) p.27.

Portanto, o estudo do gênero *Drosophila* e suas respectivas espécies fornecem um poderoso sistema para estudar a interação entre a ecologia e evolução. Sabe-se informações sobre ecologia, sistemática, modos de vida, genética, desenvolvimento e biologia molecular de algumas espécies do gênero, como exemplo *Drosophila melanogaster*. Todo este conhecimento fornece base para testar hipóteses ecológicas e

inferir os processos evolutivos subjacentes aos padrões observados (POWELL, 1997; MARKOW & O' GRADY, 2008)

1.2 MARCADORES DE SEQUÊNCIA E DNA MITOCONDRIAL

Diversos marcadores moleculares têm sido amplamente empregados em análises de populações naturais para verificar sua estruturação, a existência de fluxo gênico e em investigações de eventos ecológicos e evolutivos. Sendo assim, os marcadores ajudam a contar a história evolutiva de uma espécie (CHAMBERS; MACAVOY, 2000; SELKOE; TOONEN, 2006). Para uma sólida compreensão dos padrões e processos evolutivos é necessário relacionar o conhecimento genético com um contexto ecológico, pois são aspectos que se complementam (TIDON, 2006).

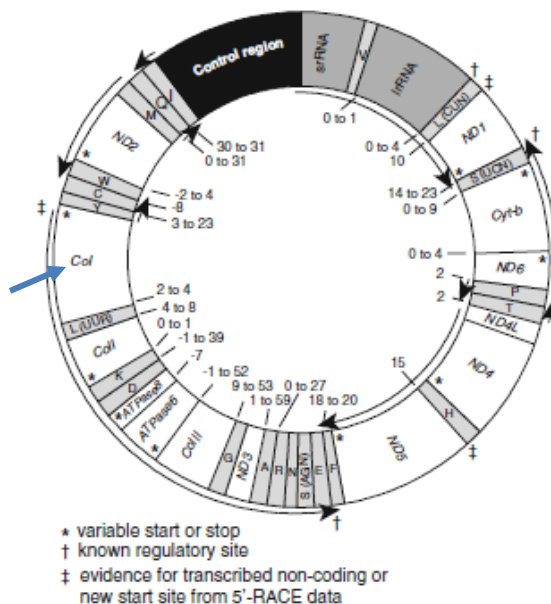
Dentre os diferentes tipos de marcadores utilizados estão os marcadores moleculares de sequências.

Marcadores de sequência são utilizados em estudos de sistemática filogenética; para a determinação da variabilidade genética intra e interpopulacional e para compreender eventos demográficos passados que influenciou a atual distribuição geográfica da diversidade genética. Os marcadores de sequência podem ser isolados a a partir de genomas nucleares e citoplasmáticos (mitocôndria e cloroplasto) e de diferentes regiões tanto de DNA codificador como não codificador. (SEGATTO; GOETZE; TURCHETTO, 2017 p. 77)

Os primeiros trabalhos filogenéticos em animais utilizaram sequências de DNA mitocondrial (SEGATTO; GOETZE; TURCHETTO, 2017). O DNA mitocondrial animal é uma molécula de DNA circular, compacta, apresenta em torno de 16-20 kb e contém 37 genes (13 genes codificadores de proteína, 2 rRNA e 22 tRNA) envolvidos na fosforilação oxidativa. Este padrão é conservado entre os bilateria, salvo algumas exceções (LADOUKAKIS; ZOUROS, 2017). O mtDNA de *Drosophila* possui um região rica em A+T não codificante, responsável pela origem de replicação e transcrição da molécula de mtDNA (WOLSTENHOLME, 1992). Essa região varia em tamanho, cerca de 1-5 kb entre as espécies de *Drosophila* e pode variar entre as populações de uma mesma espécie ou em apenas um indivíduo de uma dada população (FAURON; WOLSTENHOLME, 1976). O Modelo de

conteúdo e organização do genoma mitocondrial de *Drosophila* encontra-se na Figura 2.

Figura 2. Modelo de conteúdo e organização do genoma mitocondrial baseado em 12 espécies de *Drosophila*.



Nota: Seta em azul destacando localização do gene COI. Fonte: MONTHOTH et al. (2009) p. 9

Existem vários motivos para que os marcadores de sequências mitocondriais venham sendo amplamente utilizados em estudos populacionais: embora o arranjo de genes seja conservado a taxa de mutação é em geral mais alta, quando comparada a de um gene de cópia única do genoma nuclear (SOLFERINI; SELIVON 2012; (LADOUKAKIS; ZOUROS, 2017), sendo basicamente consequência de mutações de ponto (AVISE *et al*, 1987), que acumulam-se possivelmente pelo fato dos mecanismos de reparo que atuam no mtDNA sejam menos rigorosos em comparação aos que atuam no DNA nuclear (WILSON *et al*, 1985; ALEXEYEV *et al.*, 2013). As altas taxas de mutação mostram altos níveis de polimorfismo em algumas regiões da molécula e muitas vezes revelam múltiplas linhagens genéticas dentro e entre populações (FREELAND, 2005). Há um grande número de cópias do genoma

mitocondrial por célula e ele pode ser extraído e analisado a partir de amostras antigas (ARIF; KHAN, 2009). Adicionalmente, uma das principais característica que fazem desta molécula um importante marcador é sua herança preponderantemente materna,(ROKAS; LADOUKAKIS; ZOUROS, 2003).

1.2.1 Citocromo Oxidase I

O gene Citocromo oxidase I codifica a maior subunidade da enzima citocromo oxidase, catalisador terminal da cadeia de transporte de elétrons e responsável pela translocação de prótons através da membrana durante a respiração celular (SARASTE, 1990).

Este gene é utilizado como marcador universal para o código de barras genético (DNA *Barcoding*) por se mostrar ser um marcador espécie-específico (HEBERT; CYWINSKA; BALL, 2003) pois suas proteínas possuem domínios funcionais altamente conservados e regiões variáveis (SARASTE, 1990). As sequências do gene *COI* tem se mostrado efetivas na identificação vertebrados (HEBERT *et al.*, 2004; WARD *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2011) e invertebrados (HEBERT.; RATNASINGHAM; WAARD, 2003; SMITH *et al.*, 2007). No gênero *Drosophila* este gene vem sendo amplamente utilizado em estudos filogenéticos e populacionais (BRITO; MANFRIN; SENE, 2002; HURTADO; EREZ; CASTREZANA, 2004; MIROL *et al.*, 2007; PFEILER *et al.*, 2007; RICHMOND *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; FRANCO; MANFRIN 2013; RÉ *et al.*, 2014) e vem se mostrado eficiente para acessar a variabilidade genética intra e interespecífica.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a variabilidade genética de populações naturais são extremamente importantes para compreender a história evolutiva de uma espécie (MATEUS; SENE, 2003) e para o estabelecimento de práticas conservacionistas mais eficientes (FRANKEL, 1983). Nesse contexto, a genética de populações tornou-se uma ferramenta importante devido à sua capacidade de descrever a variação genética em populações e compreender os mecanismos de manutenção dessa variabilidade (NEI, 1987).

Este TCC faz parte de um projeto maior intitulado: “Avaliação da preservação e conectividade entre três fragmentos de floresta ombrófila densa do leste catarinense utilizando drosofilídeos (Insecta: Diptera) como bioindicadores”. O projeto envolve abordagem ecológica, com levantamento da diversidade de espécies de *Drosophila* coletadas em três Unidades de Conservação (UCs) de Santa Catarina, a aplicação de índices ecológicos e também abordagem molecular usando dois marcadores moleculares (COI e o gene *period*). Estas abordagens são de grande importância na avaliação da biodiversidade e conservação de ambientes.

Sendo assim, os resultados obtidos neste projeto de TCC contribuirão para um melhor entendimento da dinâmica de populações de *Drosophila* em ambientes de Mata Atlântica, e na avaliação do estado de conservação das UCs amostradas neste projeto.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade e a estrutura genética de três populações de *Drosophila capricorni* oriundas de Unidades de Conservação do Estado de Santa Catarina, usando como marcador molecular um fragmento do gene citocromo oxidase I (*COI*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Através do uso de diferentes softwares comumente empregados para análises em genética de populações e filogeografia este trabalho tem os seguintes objetivos:

- I. Analisar as sequências do fragmento do gene COI para verificar a variabilidade genética de populações de *Drosophila capricorni* de UCs de Santa Catarina.
- II. Verificar se existe estruturação genética entre estas populações.
- III. Fazer algumas inferências sobre a história evolutiva destas populações.
- IV. Com base nos resultados encontrados contribuir na avaliação da conservação destas UCs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

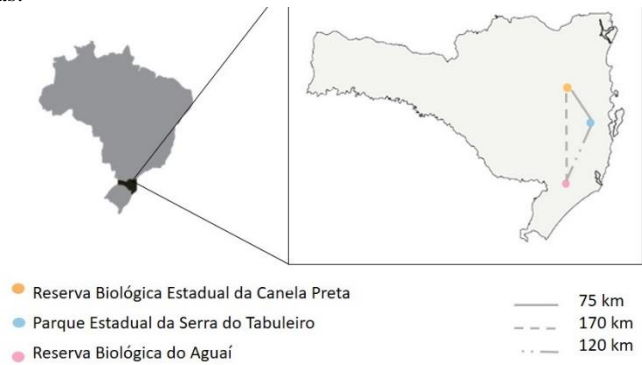
Indivíduos adultos de *Drosophila capricorni* foram coletados de três unidades de conservação do estado de Santa Catarina, sendo elas: Reserva Biológica Estadual da Canela Preta (norte do estado), Reserva Biológica Estadual do Aguaí (sul do estado) e o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro (centro do estado) (Figura 3). As coordenadas geográficas dos pontos de coleta estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2.Coordenadas geográficas das populações amostradas.

Unidades de conservação			
	Aguaí	Canela Preta	Tabuleiro
Latitude	28° 25' 33,86"S	27° 16' 9,55"S	27° 45' 3,71"S
Longitude	49°32'39,61"O	49° 08' 0,02"O	48° 47' 0,89"O

Nota: Aguaí =Reserva Biológica Estadual do Aguaí; Canela Preta = Reserva Biológica Estadual da Canela Preta; Tabuleiro = Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. Fonte: Elaborado pelo autor.

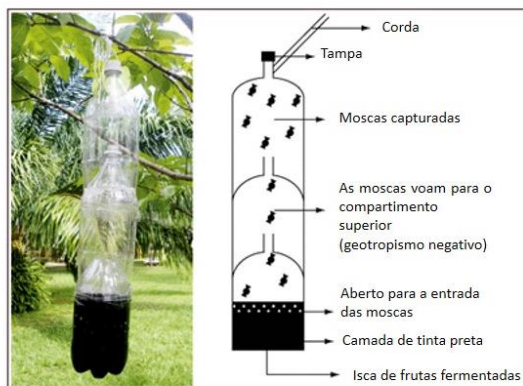
Figura 3. Localização das três Unidades de Conservação e distância em linha reta entre elas.



Nota: A distância em linha reta entre cada unidade de conservação foi calculada com o auxílio da ferramenta google maps (<https://www.google.com.br/maps>)
Fonte: Elaborado pelo autor.

A captura das moscas foi realizada com a utilização de 80 armadilhas confeccionadas com garrafas PET, segundo a metodologia de Tidon e Sene, 1988, contendo iscas de frutas fermentadas (mistura de banana, laranja e abacaxi) (Figura 4). As armadilhas foram penduradas em árvores ao longo das trilhas.

Figura 4. Armadilha utilizada para captura de *Drosophila* confeccionadas segundo o modelo de Tidon e Sene (1988).



Fonte: Adaptado de PENARIOL; BICUDO; MADI-RAVAZZI (2008) p. 49

As coletas foram efetuadas entre a primavera de 2013 e o verão de 2016. A classificação taxonômica das espécies foi realizada com base em caracteres morfológicos utilizando-se chave de identificação de gêneros e espécies de *Drosophila* (FREIRE-MAIA; PAVAN, 1949). Cada indivíduo de *Drosophila capricorni* coletado foi armazenado em tubo de 1,5ml com etanol absoluto e congelado para posterior extração de DNA.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total das amostras foi extraído utilizando PureLink® Genomic DNA Micro Kit (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi armazenado em freezer (-20°C) até a realização das reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA genômico foi extraído apenas de indivíduos machos, para diminuir as etapas metodológicas necessárias para o uso do outro marcador molecular (o gene *period*) que também foi utilizado nestas populações. Embora o enfoque deste projeto de TCC seja o gene COI, o

gene *Period* também foi amplificado a partir destas amostras. Este é ligado ao X em espécies de *Drosophila* (CITRI et al, 1987; FRANCO et al., 2010), e com o uso apenas de machos temos a certeza da amplificação de apenas um alelo.

4.3 CITOCROMO OXIDASE I

O par de *primers* utilizado para amplificação de um fragmento do gene citocromo oxidase I (COI) foi: COI-F: 5' CWA CAA ATC ATA AAG ATA TTG GAAC 3' e COI-R: 5' GTT TCC TTT TTT CCT GAT TCTTG 3'. Este par foi desenhado em regiões conservadas, a partir de um alinhamento de sequências de diferentes espécies de *Drosophila*, obtidas a partir do banco de dados GenBank: *Drosophila cardini* (HM 006874), *Drosophila capricorni* (EU493637), *Drosophila willistoni* (EU 493643) e *Drosophila mauritiana* (NC005779).

As condições de amplificação do *amplicon* do COI padronizadas para *D. capricorni* são: 1U de *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific), 1 x Buffer, 2.5 mM MgSO₄, 150µM de cada dNTP, 0.4µM de cada *primer* para um volume final de 40µl. As condições de amplificação são: uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3min, seguido por 35 ciclos a 95°C por 50s, 48°C por 50s e 72°C por 1min, seguido por uma etapa de extensão final de 72°C por 7min.

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corados com gel red sob um transiluminador de luz UV.

4.4 SEQUENCIAMENTO

Os *amplicons* do gene COI, das amostras populacionais de *Drosophila capricorni* foram enviados para as empresas Helixxa (Paulínia, SP) e WEMSeq (Curitiba, PR) para purificação e sequenciamento direto dos produtos de PCR. Foram sequenciadas ambas as fitas dos *amplicons* usando-se os mesmos *primers* da amplificação.

4.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

A identidade das sequências foi confirmada com o uso da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) disponível no banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para a análise das sequências foram utilizados os seguintes softwares: FinchTV v1.3.0 (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>) para a observação dos

cromatogramas; Mega 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) para alinhamento e edição das sequências, análise do conteúdo de nucleotídeos e aminoácidos; DNASP 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) para análise dos polimorfismos e testes de neutralidade; PROSEQ 2.91 (FILATOV, 2002) para os cálculos de Fst; TCS 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) para a construção da rede de haplótipos, o qual utiliza um algoritmo de parcimônia estatística, e foi usado o limite de confiança de 95%. O software online Selecton (<http://selecton.tau.ac.il/index.html>), o qual usa uma inferência Bayesiana, foi utilizado para verificar a ação de seleção nas sequências. Para esta análise foi aplicado o modelo evolutivo M8 pois permite a detecção de seleção positiva e purificadora (STERN *et al.*, 2007).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE MTCOI

Os resultados apresentados foram obtidos a partir do sequenciamento de 663 pares de bases (pb) do gene mitocondrial Citocromo oxidase I (mtCOI) de 32 indivíduos machos (9 Aguai, 13 Canela preta e 12 Tabuleiro) das três unidades de conservação de Santa Catarina. Em relação a composição de nucleotídeos desta região a frequência encontrada foi: T (39,5%), A (28,5%), C (15,0%), G (17,1%). Sendo o conteúdo A-T > C-G, o que está de acordo com o encontrado em genes mitocondriais de *Drosophila* (MONTTOOTH *et al.*, 2009). A região analisada corresponde a uma sequência de 221 aminoácidos, composta principalmente por resíduos de Leucina (14,47%) e Glicina (10,40%).

5.2 ANÁLISES DE DIVERSIDADE

Considerando as 3 populações juntas foram observados 19 haplótipos e 20 sítios polimórficos, o valor médio da diversidade nucleotídica (π) foi 0,00440. O maior valor de π encontrado foi da população Canela Preta, que possui onze haplótipos (Tabela 3). O valor médio de diferenças de nucleotídeos (K) encontrado foi 2,917.

A diversidade de nucleotídeos total (Tabela 2) calculada para o gene COI de populações de *D. capricorni* foi maior que as descritas em outros trabalhos com COI em populações de *Drosophila* do Brasil, como por exemplo, Ré *et al.*, 2014 analisaram 683pb em populações de *D. maculifrons* da região sul e sudeste do Brasil e encontraram quatro haplótipos e o valor médio de $\pi = 0,00012$ (RÉ *et al.*, 2014). GUSTANI *et al.*, (2015) ao analisarem 717pb encontraram o valor médio de $\pi = 0,000269$, que produziram 6 haplótipos nas populações de *D. ornatifrons* coletadas em Guarapuava/PR, Chapecó/SC e no Noroeste e litoral do Rio Grande do Sul. Num estudo filogeográfico com *D. buzzatii*, onde foi analisado um fragmento de 646pb, as populações brasileiras analisadas, que na maioria eram da região Sudeste, apresentaram um valor médio de $\pi = 0,00371$ (BRITO; MANFRIN; SENE, 2002). Porém, quando comparado com o valor médio encontrado para amostras de quatro populações de *D. buzzatii* com diversidade de nucleotídeos igual a $(0,00465 \pm 0,00130)$ do sul do Brasil (BRITO; MANFRIN; SENE, 2002), o valor médio de π de *D. capricorni* é menor, entretanto, esse resultado

pode ser um reflexo do baixo número amostral de indivíduos (somente 8) analisados desta região.

Tabela 3 Índices de diversidade genética de populações de *D. capricorni* de Santa Catarina, usando o marcador mitocondrial COI.

Populações	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>K</i>	π	<i>Sin</i>	<i>Nsin</i>
Aguai	07	8	7	1,000	2,762	0,00417	8	0
Canela Preta	13	13	11	0,962	3,256	0,00491	12	1
Tabuleiro	12	9	7	0,833	2,273	0,00344	9	0
Total ^a	32	20	19	0,931	2,917	0,00440	19	1

Nota: *N* = número de indivíduos; *S* = número de sítios polimórficos; *h* = número de haplótipos; *Hd* = Diversidade de haplótipos; *K* = número médio de diferenças de nucleotídeos; π = diversidade de nucleotídeos; *Sin* = número de substituições sinônimas; *NSin* = número de substituições não sinônimas; *a* = considerando as populações juntas. (Fonte: Elaborado pelo autor)

Os valores de *Fst* foram calculados par a par para analisar as diferenças genéticas e uma possível estruturação entre as populações. O único valor de *Fst* significativo foi entre as populações Tabuleiro e Aguai (Tabela 4). Estas populações se distanciam em cerca de 120 km em linha reta (Figura 3). A UC de Aguai foi pioneiramente amostrada para a sua fauna de insetos, neste trabalho, e ela está localizada próxima as cidades de Siderópolis e Criciúma. A ação antrópica devido à presença destas cidades e da atividade siderúrgica na região, pode estar levando a uma diminuição nos corredores ecológicos que ligam as populações de drosofilídeos de Aguai com algumas regiões da Serra do Tabuleiro. Como o *COI* é um marcador mitocondrial, faz parte de um genoma haplóide e herdado maternalmente, o tamanho populacional efetivo (*Ne*) e o tempo de coalescência são menores do que os de genes nucleares. Os marcadores nucleares são mais lentos para indicar processos de estruturação genética, comparado com o DNA mitocondrial, que é mais adequado para indicar divergências recentes (TOEWS; BRELSFORD, 2012). Sequências mitocondriais e do cromossomo Y, devido ao seu nível de ploidia e forma de herança, tendem a detectar eventos e processos recentes na história evolutiva de uma espécie, enquanto sequências de genes autossômicos e ligados ao X primariamente detectam eventos e processos mais antigos (TEMPLETON, 2011).

Espera-se que as populações mais distantes geograficamente apresentem maior diferença genética, mas Canela Preta e Aguai não apresentaram diferenciação genética significativa, na verdade dentre as

três comparações esta apresentou o menor valor de F_{st} (Tabela 4). O fluxo gênico entre estas populações deve acontecer através de corredores ecológicos que ainda as interligam e também devido à retenção de polimorfismo ancestral.

Tabela 4 Resultados do testes de F_{st} e polimorfismo compartilhados e não compartilhado entre as populações de *D.capricorni*.

Comparações populacionais	Valores de F_{st}	Polimorfismo Compartilhado	Polimorfismo não compartilhado
CP (1) x AG (2)	0,0185 P= 0,2040	4	9 ^a /4 ^b
TB (1) X AG (2)	0,1675 P= 0,0380*	4	5 ^a /4 ^b
CP (1) X TB (2)	0,0459 P= 0,1520	6	7 ^a / 3 ^b

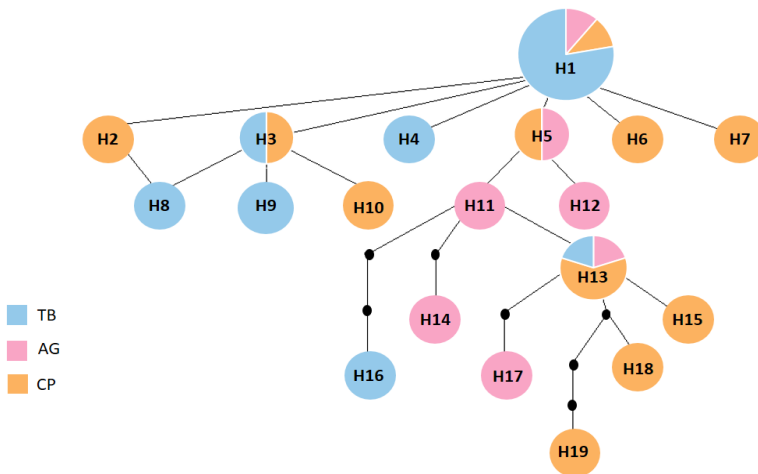
Nota: a= número de sítios polimórficos na população 1 e monomórfico na população 2; b= n° de sítios polimórficos na população 2 e monomórfico na população 1. AG=Reserva Biológica Estadual do Aguai; CP= Reserva Biológica Estadual da Canela Preta; TB= Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. *= p < 0,05. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS

Foram amostrados 19 haplótipos nestas populações de *D. capricorni*, sendo que apenas dois deles estão presentes nas três populações, H1 e H13. O haplótipo H1 foi o mais frequente e possui 7 indivíduos, destes: 5 são do Tabuleiro, 1 da Canela Preta e 1 do Aguai. Este é o provável haplótipo ancestral, pois foi o mais frequente, foi encontrado nas três populações e os demais haplótipos derivam dele (Figura 5). Dois haplótipos (H3 e H5) são compartilhados entre duas populações e 14 haplótipos, cerca de 73,68%, são haplótipos únicos (*singletons*) sendo representados por apenas um indivíduo.

A população que apresentou maior diversidade de haplótipos foi Aguai ($H_d=1,000$) pois cada um dos sete indivíduos coletados representam um haplótipo diferente, e a diversidade média considerando as três populações foi $H_d=0,931$ (Tabela 3).

Figura 5. Rede de haplótipos construída a partir das sequências COI das três populações de *Drosophila capricorni*.



Nota: Cada linha representa um passo mutacional e os círculos pretos representam haplótipos hipotéticos não amostrados. Cada população está representada por uma cor. AG=Reserva Biológica Estadual do Aguaí; CP= Reserva Biológica Estadual da Canela Preta; TB= Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. Os círculos representam os haplótipos amostrados e o tamanho é proporcional a sua frequência nas populações. O número de indivíduos por haplótipo está distribuído da seguinte forma: H1: 7 indivíduos; H3, H5 e H9: 2 indivíduos; H13: 5 indivíduos; os demais haplótipos possuem apenas 1 indivíduo.

Fonte: Elaborado pelo autor

5.4 TESTES DE NEUTRALIDADE

Diferentes testes de neutralidade (Fu and Li D*, Fu and Li F*, Fs de Fu, R2 e Tajima D) foram realizados para inferir se as sequências estavam evoluindo de maneira neutra (Tabela 5). Os resultados em sua maioria foram negativos, mas somente os testes Fs de Fu e R2 apresentaram desvios significativos nas populações Aguaí e Canela Preta e quando considerando as três populações juntas (Tabela 5). Desvios da neutralidade podem ser causados tanto por mecanismos de seleção quanto por eventos demográficos. Os diferentes testes para detectar desvios significativos da neutralidade usam estatísticas diferentes, e os resultados obtidos em cada um ajudam a providenciar evidências da provável causa que justificaria o padrão de polimorfismo encontrado (HURTADO;

EREZ; CASTREZANA, 2004; JURI *et al.*, 2014). Considerando que os testes F_s de F_u e R_2 são os mais sensíveis para captar eventos demográficos (FU, 1996; RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002), sendo o teste R_2 mais indicado para pequenas amostragens (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002; RAMIREZ-SORIANO *et al.*, 2008) como é o caso da população Aguaí deste trabalho, os desvios encontrados são provavelmente resultantes de processos locais de expansão populacional. Outro fator que reforça a hipótese de expansão populacional é a presença de muitos haplótipos únicos encontrados em apenas uma população (AVISE, 2000), pois o evento de expansão pode ter ocorrido num passado relativamente recente da espécie, e tais haplótipos, mais derivados, continuam restritos a uma localidade. Para estimar o tempo aproximado da expansão populacional foi calculado com a fórmula (1).

$$t = \tau / 2\mu, \quad (1)$$

Onde μ é a taxa de mutação estimada em $5,7 \times 10^{-8}$ substituições/sítio/ano (TAMURA, 1992) e $\tau = 2,430$, estimado pelo software DNASP, com base no valor médio de diferenças por pares entre as sequências.

Sendo assim chega-se a um tempo estimado em $t = 21.315.789$ gerações, e considerando entre 20 e 25 gerações por ano, chega-se ao tempo aproximado da expansão entre 1.066.000 e 852.600 anos atrás, ou seja, no Pleistoceno.

Tabela 5. Resultados dos testes de neutralidade usados para análise dos polimorfismos de um fragmento do gene COI em populações de *D. capricorni* de Santa Catarina

Populações	Fu and Li D*	Fu and Li F*	Fs de Fu	R2	Tajima D
Aguaí	-0,8709	-0,9375	-4,663*	0,1230*	-0,8099
Canela Preta	-1,4556	-1,4986	-6,674*	0,0958*	-0,9170
Tabuleiro	-0,7586	-0,9214	-2,163	0,1248	-0,9636
Total ^a	-2,5133	-2,5439	-12,975*	0,0620*	-1,4199

Fonte: Elaborado pelo autor.

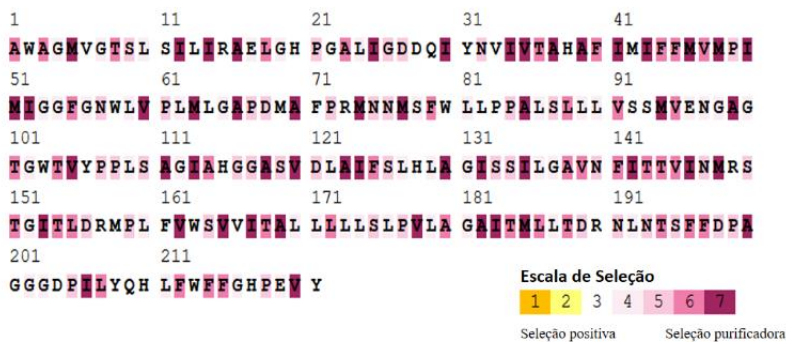
Entretanto, para uma confirmação da hipótese de expansão seria necessário uma amostragem de outras populações de *D. capricorni*,

até mesmo para uma estimativa mais precisa do tempo em que tal expansão ocorreu.

Além disso, sabe-se que genes mitocondriais em *Drosophila* sofrem forte seleção purificadora (MONTTOOTH *et al.*, 2009; BALLARD & KREITMAN, 1994). Segundo a teoria neutra, mutações capazes de mudar a função de uma proteína são na maioria dos casos deletérias e alvo da seleção purificadora (KIMURA, 1968). Das substituições presentes nessa sequência, a maioria são substituições sinônimas (19), que não modificam o aminoácido codificado, sendo que apenas a população Canela Preta apresentou uma substituição não sinônima (Tabela 3). Esta substituição foi do aminoácido Valina para o aminoácido Metionina, ambos apolares.

Para verificar a ação da seleção purificadora neste fragmento do gene *COI* foi realizado um teste de seleção, num software que utiliza uma análise bayesiana, e o resultado do teste mostrou que grande parte dos códons dessa sequência está sobre forte influência da seleção purificadora (Figura 6).

Figura 6. Resultado do teste de seleção, realizado no software online Selecton, para o fragmento de 663 pb do gene *COI* em *D. capricorni*.



Fonte: Selecton: <http://selecton.tau.ac.il/results/1527286585/colors.html>

6 CONCLUSÃO

- A população que apresentou a maior diversidade genética, em relação a diversidade de nucleotídeos, número de haplótipos e número médio de diferenças de nucleotídeos foi Canela Preta, o que está de acordo com dados ecológicos que têm sido obtidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Drosofilídeos, que mostram que esta UC é a mais conservada, em relação a sua fauna de Drosofilídeos pois apresenta uma maior diversidade de espécies típicas de Mata Atlântica, e menor número de espécies cosmopolitas, típicas de áreas alteradas pela ação antrópica. Dessa forma vemos uma relação entre o grau de conservação da UC ao qual esta população faz parte refletindo nos dados de diversidade genética.

- Comparado com a diversidade de nucleotídeos encontrada em outras espécies de *Drosophila* para este mesmo marcador molecular, as populações aqui analisadas mostram uma boa diversidade genética, provavelmente como resultado dos diferentes nichos que estas regiões de Mata Atlântica apresentam e que podem ser explorados por este e outros drosofilídeos.

- Nota-se uma diferenciação genética entre as populações do Aguai e Tabuleiro, provavelmente resultante de uma restrição no fluxo gênico entre elas devido a uma maior degradação no ambiente em torno do Aguai pela presença de áreas urbanas próximas e de atividade siderúrgica na região.

- Os desvios significativos dos testes R2 e Fs de Fu (e negativos no caso deste teste), e o número significativo de haplótipos únicos apontam para uma hipótese de expansão populacional local, apesar de não podermos descartar totalmente a influência da seleção purificadora em tais resultados.

REFERÊNCIAS

- ALEXEYEV, M.; SHOKOLENKO, I.; WILSON, G.; LEDOUX, S. The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity-Critical Analysis and Update. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 5, p.1-17, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215(3): p. 403-410, 1990.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife Animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32(1): p. 9 -17, 2009.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. **The History and Formation of Specie**. Cambridge, Massachusetts: Havard University Press, 2000.
- BÄCHLI, G. TaxoDros: **The Database on Taxonomy of Drosophilidae**, Versão 1.04 Database, 2017. Disponível em:< <http://www.taxodros.uzh.ch/search/class.php>> Acesso em: 20 de abril de 2018.
- BALLARD, J. W. O.; KREITMAN, M. Unravelling selection in the mitochondrial genome of *Drosophila*. **Genetics Society Of America**, v. 3, n. 138, p.757-772, 1994.
- BIZZO, L., GOTTSCHALK, M. S., TONI, D. C. D., HOFMANN, P. R. P. Seasonal dynamics of a drosophilid (Diptera) assemblage and its potencial as bioindicator in open environments. *Iheringia, Série Zoologia* 100, 185-191, 2010.
- BRITO, R. A.; MANFRIN, M. H.; SENE, F. M. Mitochondrial DNA phylogeography of Brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p.161-171, 2002.

BROWN, Jr .K. S. Conservation of Neotropical environments: insects as indicators. In: **The Conservation of Insects and Their Habitats**. COLLINS N.M; THOMAS J.A. (Eds). Royal Entomology Society. Symposium XV, pp. 349–404. London: Academic Press, 1991.

BROWN, Jr .K. S. Diversity, disturbance, and sustainable use of Neotropical forests: insects as indicators for conservation monitoring. **Journal of Insect Conservation**, v.1, n. 1, p.25-42, 1997.

BRUSCA, R. C.; G. J. BRUSCA. Filo Arthropoda: Os Hexapoda (Insetos e formas aparentadas). In: BRUSCA, R.C.; G.J. BRUSCA (Org). **Invertebrados**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan., p. 613-660, 2007.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126: p. 455-76, 2000.

CITRI, Y.; COLOT, H. V.; JACQUIER, A. C.; HALL, J. C.; BALTIMORE, D.; ROSBASH, M. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. **Nature**, v. 326. p. 42–47, 1987.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Versão 1.21. **Molecular Ecology**, 9(10): 1657-1660, 2000.

DOBZHANSKY, T.; PAVAN, C. Studies on Brazilian species of *Drosophila*. **Boletins da Faculdade de Filosofia e Ciências de São Paulo** 36(4): 7-72, 1943.

DOBZHANSKY, T.; POWELL, J. R. The *willistoni* group of sibling species of *Drosophila*. In: KING, R. C. (Ed). **Handbook of Genetics**, New York: Plenum Publishing Corporation, v. 3, p. 589-622, 1975.

EHRMAN, L.; POWELL, J. R. The *willistoni* species group. In: **The Genetics and Biology of *Drosophila***. M. ASHBURNER, J. N. THOMPSON; H. L. CARSON, (Eds), Vol. 3b, p. 193–225. Academic Press, London, 1982.

FAURON, C. M. R., WOLSTENHOLME, D. R. Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.73: 3623-3627, 1976.

FILATOV, D.A. Proseq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequences data sets. **Molecular Ecology Notes** 2, 621-624, 2002.

FRANCO, F. F.; SILVA-BERNARDI, E. C. C.; SENE, F.M.; HASSON, E.R.; MANFRIN, M. H. Intra-and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene *period* in species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48 (4): p. 322-331, 2010.

FRANCO, F. F.; MANFRIN, M. H. Recent demographic history of cactophilic *Drosophila* species can be related to the Quaternary paleoclimatic changes in South America. **Journal of Biogeography**, v. 40, p. 142-154, 2013.

FRANKEL, O. H. The place of management in conservation. In: SCHOENWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, B.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (Eds.). **Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations**. Menlo Park, California: The Benamin/Cumming, p.1-14, 1983.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. Introdução ao estudo da *Drosophila*. **Cultus**, v. 5 (1): p. 1-171, 1949.

FREELAND, J.R. Molecular markers in ecology. In: FREELAND, J.R (Org). **Molecular Ecology**. Estados Unidos: John Wiley & Sons, p. 31-61, 2005.

FU, Y. X., New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. **Genetics**,143: 557–570, 1996.

GOTTSCHALK, M. S. **Influência da urbanização sobre assembléias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil**. 2004. 111 f.

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

GUSTANI, E.C.; OLIVEIRA, A.P.F.; SANTOS, M.H.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R. P. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. **Zoological Science**, v. 32: p. 141-150, 2015.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p.313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; WAARD, J. R. de. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1, p.96-99, 2003.

HEBERT, P. D. N.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, 2(10): 312. p. 1657-1663, 2004.

HURTADO, L.A.; EREZ, T.S.; CASTREZANA, T.A. Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonoran Desert cactophilic *Drosophila*. **Molecular Ecology**, v. 13. p. 1365–1375, 2004.

JENNINGS, B. H. *Drosophila*: A versatile model in biology and medicine. In: LOU J.; YUSHIN, G. (Eds). **Materials Today**, 14 (5), p. 190-195, 2011.

JURI, M. J. D.; MORENO, M.; IZAGUIRRE, M. J. P.; NAVARRO, J. C.; ZAIDENBERG, M. O.; ALMIRÓN, W.R.; CLAPS, G.L.; CONN, J.E. Demographic history and population structure of *Anopheles pseudo punctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. **Parasites & Vectors**, v.7: p. 1-9, 2014.

KIMURA, M. Evolutionary Rate at the Molecular Level. **Nature**, v. 217, n. 5129, p.624-626, 1968.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p.1870-1874, 2016.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25 (11): p. 1451–1452, 2009.

LUO, A.; ZHANG, A.; HO, Y. W. S.; XU, W.; ZHANG, Y.; SHI, W.; CAMERON, S.L.; ZHU, C. Potential efficacy of mitochondrial genes for animal DNA barcoding: a case study using eutherian mammals. **Biomed Central Genomics**, v. 12, n. 1, p.1-13, 2011.

MANFRIN, M. H; SENE, F. M. Cactophilic *Drosophila* in South America: A model for evolutionary studies. **Genetica**, v. 126, n.1, p. 57-75, 2006.

MARTINS, M. B. 2001. *Drosophilid Fruit-Fly Guilds en Forest Fragments*. In: BIERREGAARD, R.O; GASCON, C.; LOVEJOY, T.E.; MESQUITA, R. (Eds), **Lessons from Amazonia: The ecology & conservation of a fragmented forest**. p. 175-186. New Haven & London: Yale University Press, 2001.

MATEUS, R. P.; SENE, F. M. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41, p. 219-233, 2003.

MIROL, P. M.; SCHÄFER, M. A.; ORSINI, L.; ROUTTU, J.; SCHLÖTTERER, C.; HOIKKALA, C. A.; BUTLIN, R.K. Phylogeographic patterns in *Drosophila montana*. **Molecular Ecology**, v. 16. p. 1805-1097, 2007.

MONTOOTH, K. L.; ABT, D. N.; HOFMANN, J. W.; RAND, D. M. Comparative Genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel Features of Conservation and Change Across Functional Domains and Lineages. **Journal of Molecular Evolution**, v. 69, n. 1, p.94-114, 2009.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, p. 512, 1987.

O'GRADY, P. M.; DESALLE, R. Phylogeny of the Genus *Drosophila*. **Genetics**, v. 209, n. 1, p.1-25, 2018.

PENARIOL, L.; BICUDO, H. E. M. C; MADI-RAVAZZI, L. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, v. 8: p. 47-51, 2008.

POWELL, J. R. **Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model**. Inglaterra: Oxford University Press. p. 578, 1997.

PYLE, R; BENTZIEN, M; OPLER, P. Insect Conservation. **Annual Review of Entomology**, v. 26, n. 1, p.233-258, 1981.

PFEILER, E.; EREZ, T.; HURTADO, L.A.; MARKOW, T.A. Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila pachea* from the Sonoran Desert. **Hereditas**, v. 144, n. 2, p.63-74, 2007.

RAMIREZ-SORIANO, A.; RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J.; CALAFELL F.; NAVARRO A. Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination. **Genetics**, v. 179, n. 1, p.555-567, 2008.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19: p. 2092-2100, 2002.

RÉ, F. C.; GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; MACHADO, L. P .B.; MATEUS. R. P.; LORETO. E. L. S.; ROBE, L. J. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae). **Biological Journal Of The Linnean Society**, v. 112, n. 1, p.55-66, 2014.

RICHMOND, M. P.; JOHNSON, S.; HASELKORN, T. S.; LAM, M.; REED, L. K.; MARKOW, T. A. Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or a host switch? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 108, n. 1, p.68-78, 2012.

ROKAS, A; LADOUKAKIS, E; ZOUROS, E Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 8, p.411-417, 2003.

ROSENBERG, D. M.; DANKS, H. V.; LEHMKUHL, D. M. Importance of insects in environmental impact assessment. **Environmental Management**, v. 10, n. 6, p.773-783, 1986.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Insetos. In: RUPPERT, E. E.; BARNES (Org). **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Editora Roca, p. 804-842, 2005.

SANTA-BRIGIDA, R. ;SCHMITZ, H. J.; MARTINS, M. B. Drosophilidae (Insecta, Diptera) in the state of Pará (Brazil). **Biota Neotropica**, vol.17, n.1,2017.

SARASTE, M. Structural features of cytochrome oxidase. **Quarterly Reviews Of Biophysics**, v. 23, n. 04, p.331-366, 1990.

SEGATTO, A. L. A; GOETZE, M.; TURCHETTO, C. Marcadores moleculares baseados na análise de sequências: utilização em filogenia e filogeografia. In: **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (orgs). Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. Pp 77-93, 2017.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p.615-629, 2006.

SMITH, M. A.; WOOD, D. M.; JANZEN, D. H.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P. D. N. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 12, p.4967-4972, 2007.

SOLFERINI, V. N; SELIVON, D. Polimorfismos de isozimas. In: **Biologia Molecular e Evolução**. MATIOLI S.R, FERNANDES F.M (eds.) Ribeirão Preto: Holos. pp 165-169, 2012.

STERN, A; DORON-FAIGENBOIM, A.; EREZ, E.; MARTZ, E.; BACHARACH, E.; PUPKO, T. Selecton 2007: advanced models for detecting positive and purifying selection using a Bayesian inference approach. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p.506-511, 2007.

STURTEVANT, A. H. Further data on maternal effects in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 21:556-70, 1935.

TAMURA, K. The Rate and Pattern of Nucleotide Substitution in *Drosophila* Mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, n.5, 814-825, 1992.

TEMPLETON, A. R. **Fluxo Gênico e História Populacional**. In: Genética de Populações e História Microevolutiva. p. 204-246. Editora SBG, Ribeirão Preto, 2011.

THOMPSON, F. C; PAPER, T. **Biosystematic Database of World Diptera**. Versão 1.5, 2013. Disponível em < <http://www.diptera.org/> > Acesso em 22 de abril de 2017.

THROCKMORTON, L. H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. In: KING, R.C. (Ed). **Handbook of Genetics**. New York: Plenum, p. 421-459, 1975.

TIDON, R.; SENE, F.M. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**, v. 67. p. 89, 1988.

TIDON, R.; LEITE, D. F.; FERREIRA, L. B.; LEÃO, B. F. D. Drosophilídeos (Diptera, Insecta) do Cerrado. In: SCARIOT, A.; FELFILI, J. M.; SOUZA-SILVA, J. C. (Ed.). **Ecologia e biodiversidade do Cerrado**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 412 p. 2005.

TIDON, R. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87. n. 2, p.233-247, 2006.

TIDON-SKLORZ, R.; SENE, F. M. Vertical and temporal distribution of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) species in a wooded area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, 52 (2). 311-317, 1992.

TOEWS, D. P. L.; BRELSFORD, A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**, v. 21: p. 3907-3930, 2012.

VILELA, C. R. Occurrence of *Drosophila flavopilosa* species group (Diptera, Drosophilidae) in the State of São Paulo (Brazil) with description of one new species. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 2, p. 63-69, 1984.

WARD, R. D; ZEMLAK T. S.; INNES B. H.; LAST P. R.; HEBERT P. D. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p.1847-1857, 2005.

WHEELER, M.R. 1981. The Drosophilidae: A taxonomic overview. In: ASHBURNER, M; CARSON, H.L.; THOMPSON, J.N. (Eds.). **The Genetics and Biology of Drosophila**. London: Academic Press, Vol. 3a, p. 1-97,1981.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S. M.; GEORGE M.; GYLLENSTEN, HELM-BYCHWSI, K. M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER E. M.; SAGE, R. D; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 26, n. 4, p.375-400, 1985.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. **International Review Of Cytology**, p.173-216, 1992.

YANG, Y.; HOU, Z. C.; QIAN, Y.; KANG, H.; ZENG, Q. Increasing the data size to accurately reconstruct the phylogenetic relationships between nine subgroups of the *Drosophila melanogaster* species group (Drosophilidae, Diptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 62, n. 1, p.214-223, 2012.

YASSIN, A. Phylogenetic classification of the *Drosophilidae rondani* (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**, v.38, n. 2, p.349–364, 2013.

YEATS D. K; WIEGMANN, B.H. Phylogeny and Evolution of Dipter: Recent insights and new perspectives In: YEATS D. K; WIEGMANN,

B.H. (Eds). **The evolutionary biology of flies**. New York: Columbia University Press, p.14-44, 2005.

ZANINI, R.; DEPRÁ, M.; VALENTE, M.L.S. On the geographic distribution of the *Drosophila willistoni* group (Diptera, Drosophilidae) – updated distribution of alagitans and bocainensis subgroups. ***Drosophila Information Service***. p.25-27, 2015.